



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09176048 A**

(43) Date of publication of application: **08.07.97**

(51) Int. Cl.

A61K 45/00
A61K 45/00
A61K 45/00
A61K 45/00
A61K 45/00
A61K 45/00
A61K 45/00
A61K 45/00
A61K 45/00
A61K 45/00
A61K 45/00
A61K 45/00
A61K 45/00
A61K 45/00
A61K 45/00
A61K 45/00
A61K 45/00
A61K 45/00
A61K 45/00
A61K 45/00
A61K 45/00
A61K 45/00
C07K 14/705
C12N 5/10
C12N 15/09
C12P 21/02
C12Q 1/00
/(C12P 21/02 , C12R 1:91), (C12Q 1/00
, C12R 1:91)

(21) Application number: 07342130

(22) Date of filing: 28.12.95

(71) Applicant: **TAKEDA CHEM IND LTD**

(72) Inventor: **HONDA SUSUMU**
FUJISAWA TOMOYUKI

(54) PRODUCTION OF HUMAN
MIP-1ALPHA/PANTES RECEPTOR PROTEIN
AND USE THEREOF

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an antagonist or an agonist which is useful in treatment for viral diseases, tumors and the like by utilizing a high-affinity substance obtained by screening with human MIP (macrophage inflammatory protein)-1 α /RANTES receptor.

SOLUTION: A DNA coding the human MIP-1 α /RANTES receptor protein (for example, cDNA having the base sequence of the formula) is introduced into CHO cells to obtain a CHO cell strain stably and highly expressing the human MIP-1 α /RANTES receptor. This cell or a cell membrane fraction are used to screen the test compounds. The compound of high affinity to human MTP-1 α /RANTES receptor or its salt is used to find out the antagonist or agonist to the human MIP-1 α /RANTES receptor.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

```

ATTTTCTG GAGGCGA GAGTCTG AGGCGCA GAGTCTG GAGTCTG  51
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  52
TCTCTTC GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  53
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  54
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  55
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  56
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  57
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  58
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  59
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  60
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  61
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  62
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  63
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  64
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  65
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  66
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  67
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  68
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  69
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  70
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  71
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  72
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  73
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  74
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  75
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  76
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  77
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  78
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  79
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  80
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  81
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  82
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  83
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  84
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  85
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  86
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  87
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  88
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  89
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  90
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  91
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  92
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  93
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  94
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  95
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  96
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  97
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  98
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG  99
GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG 100

```

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-176048

(43) 公開日 平成9年(1997)7月8日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 45/00	ADY		A 6 1 K 45/00	ADY
	AAB			AAB
	ABC			ABC
	ABE			ABE
	ABF			ABF
審査請求 未請求 請求項の数17 O L (全 19 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-342130

(22) 出願日 平成7年(1995)12月28日

(71) 出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72) 発明者 本多 進

兵庫県西宮市泉町6番22号

(72) 発明者 藤澤 朋行

茨城県つくば市梅園2丁目5-3 梅園スクエアB-206

(74) 代理人 弁理士 朝日奈 忠夫 (外1名)

(54) 【発明の名称】 ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質の製造法および用途

(57) 【要約】 (修正有)

【解決手段】 ヒトMIP-1 α /RANTES受容体を生産し続ける能力を有するCHO細胞、該CHO細胞から単離されるヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質もしくはその部分ペプチド、該ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質の製造法、該CHO細胞または該ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質もしくはその部分ペプチドを用いるヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニング方法ならびに当該スクリーニング方法で得られるヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩、および該化合物を含有する医薬に関する。

【効果】 ウイルス性疾患、感染性疾患、腫瘍、アレルギー性疾患、炎症性疾患、糖尿病性疾患、中枢性疾患、高脂血症、高コレステロール血症、骨粗鬆症、消化性潰瘍、肺・心臓における再灌流障害、不安定狭心症、一過性脳虚血発作などの予防・治療剤を早期に提供できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩と被験化合物とを接触させることを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項2】 ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞または該細胞膜画分と被験化合物とを接触させることを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項3】 ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項4】 ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞または該細胞膜画分を含むことを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項5】 ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAを保持することを特徴とするpCCRで標示される発現ベクター。

【請求項6】 ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAが配列番号：1で表される塩基配列を含有するDNAである請求項5記載の発現ベクター。

【請求項7】 請求項5記載の発現ベクターを含有することを特徴とするCHO細胞。

【請求項8】 請求項7記載のCHO細胞がCHO/CCRで標示されるCHO細胞。

【請求項9】 請求項7記載のCHO細胞から得られるヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有する細胞膜画分。

【請求項10】 請求項7記載のCHO細胞を、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質の発現可能な条件下で培養することを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質の製造法。

【請求項11】 請求項7記載のCHO細胞または請求項9記載の細胞膜画分から単離されることを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩。

【請求項12】 請求項1または請求項2記載のスクリーニング方法によって得られるヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩。

【請求項13】 請求項3または請求項4記載のスクリーニング用キットを用いて得られるヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩。

【請求項14】 ヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物がヒトMIP-1 α /RANTES受容体アンタゴニストである請求項12または請求項13記載のヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩。

【請求項15】 ヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物がヒトMIP-1 α /RANTES受容体アゴニストである請求項1

2または請求項13記載のヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩。

【請求項16】 請求項14記載のアンタゴニストあるいは請求項15記載のアゴニストを含有することを特徴とする医薬。

【請求項17】 ウイルス性疾患、感染性疾患、腫瘍、アレルギー性疾患、炎症性疾患、糖尿病性疾患、中枢性疾患、高脂血症、高コレステロール血症、透析による血小板減少症、脊髄損傷、骨粗鬆症、潰瘍性大腸炎、消化性潰瘍、敗血症ショック、肺・心臓における再灌流障害、不安定狭心症、一過性脳虚血発作、心弁膜症、臓器移植後拒絶反応、血管形成術後再狭窄、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、腎不全、子宮内膜症、肺線維症、成人呼吸逼迫症候群の予防・治療剤である請求項16記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、該ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を発現するCHO細胞、またはその細胞膜画分を用いるMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニング方法および該スクリーニング用キットに関する。また、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を生産し続ける能力を有するCHO細胞、その細胞膜画分、該CHO細胞またはその細胞膜画分から単離されるヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質およびその部分ペプチドまたはそれらの塩に関する。さらに、上記スクリーニング方法あるいは上記スクリーニング用キットを用いて得られるヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩、および該化合物を含有する医薬に関する。

【0002】

【従来の技術】 ケモカイン (chemokine, chemotactic cytokineの略) は白血球に対する遊走活性を有する一群のタンパク質である (Critical Reviews in Immunology 12: 17 - 46 (1992); Current Opinion in Immunology 6: 865 - 873 (1994))。近年ケモカインが炎症の急性期および慢性期においてその病態の発症、進展、および増悪に関与していることが明らかにされつつある。ケモカインはいずれも4個のシステインをもち、1番目と2番目のシステインの間に1個のアミノ酸が挿入されたCX Cケモカインサブファミリー (α ケモカインサブファミリー) と1番目と2番目のシステインが隣接したCCケモカインサブファミリー (β ケモカインサブファミリー) に分かれる。CCケモカインサブファミリーにはRANTES (regulated on activation, normal T expressed and secreted)、MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1 α)、MIP-1 β 、MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1)、MCP-2、MCP-3、I-309などがある。CCケモカインは単球、リンパ球、好酸球、好塩基球、肥満細胞に作用してこれらの細胞を遊走させ、また脱顆粒や種々の炎

症性メディエーターの放出などの作用をもつ。

【0003】MIP-1 α およびRANTESに高親和性のヒトMIP-1 α /RANTES受容体(CCCKR-1と略称されることもある)の構造は1993年に報告され、Gタンパクに共役した7回膜貫通型のレセプターであることがわかった(Cell 72: 415 - 425 (1993); J. Exp. Med. 177: 1421 - 1427 (1993))。慢性関節リウマチ患者滑膜組織でRANTESおよびMIP-1 α /RANTES受容体のmRNAの発現量が亢進していることが観察され(Lancet 343: 547 - 548 (1994))、また心臓移植後の心血管の内膜肥厚部位でRANTESのmRNAの発現量が亢進したので(Circulation 82: III-699 (1990))、該疾患にRANTESが関与することが示唆される。さらに、腎移植拒絶時に移植部位でRANTES mRNAの発現およびRANTESタンパク量が増加した(Lancet 343: 209 - 211 (1994))ので、臓器移植拒絶にRANTESが関与すると考えられる。また、リウマチ患者滑液中にMIP-1 α タンパクが増加することが報告され(J. Clin. Invest. 93: 921 - 928 (1994))、マウスコラーゲン関節炎実験において抗MIP-1 α 抗体の投与が関節炎の発症を遅らせ、さらに症状を緩和させた(J. Clin. Invest. 95: 2868 - 2876 (1995))。抗MIP-1 α 抗体の投与はマウス実験的自己免疫性脳脊髄炎(マウス実験的アレルギー性脳脊髄炎)にも有効であった(J. Immunol. 155: 5003 - 5010 (1995))。したがって、MIP-1 α も慢性関節リウマチの発症に関与し、またMIP-1 α は多発性硬化症にも関与すると推察される。

【0004】好酸球、好塩基球および肥満細胞は炎症部位への集積、活性化によってアレルギー性疾患の発症、進展、および増悪に関わる。RANTESは好酸球の遊走因子でもあり(J. Immunol. 176: 587 (1992); J. Immunol. 176: 1489 (1992))、ヒトにRANTESを皮内注射すると単核球と好酸球の浸潤がみられた(FASEB J. 9: A804 (1995))。以上のことから、これらのCCケモカインの作用を阻害するアンタゴニストは、慢性関節リウマチ、動脈硬化、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、多発性硬化症、腎炎などの予防・治療につながると考えられる。さらに、CCケモカインの受容体に対するアゴニストは単球などの白血球の機能を亢進させるので、抗腫瘍能などを増進させることが予想される。しかしながら、まだかかるアンタゴニストやアゴニストの報告はない。受容体のアンタゴニストやアゴニストは、受容体に特異的に結合する親和性の高い化合物を探索することによって発見できる。ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するアンタゴニストやアゴニストを見出すことを目的として、該受容体に結合する親和性の高い化合物を探索するためには、該受容体を安定に発現する細胞が必須である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】実用的なヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質の製造法およびヒトMIP-1 α /RANTES受容体高親和性化合物のスクリーニング法を提供す

る。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAをCHO細胞に導入し、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を高発現するCHO細胞株を製造することに成功した。さらに本発明者らは、該CHO細胞株を用いることにより、効率よくヒトMIP-1 α /RANTES受容体高親和性化合物またはその塩のスクリーニングを行うことができることを見出し、鋭意研究を進めて本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち本発明は、

(1) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩と被験化合物とを接触させることを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(2) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞または該細胞膜画分と被験化合物とを接触させることを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(3) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(4) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞または細胞膜画分を含むことを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(5) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAを保持することを特徴とするpCCRで標示される発現ベクター、

(6) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAが配列番号：1で表される塩基配列を含有するDNAである第(5)項記載の発現ベクター、

(7) 第(5)項記載の発現ベクターを含有することを特徴とするCHO細胞、

(8) 第(7)項記載のCHO細胞がCHO/CCRで標示されるCHO細胞、

(9) 第(7)項記載のCHO細胞から得られるヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有する細胞膜画分、

(10) 第(7)項記載のCHO細胞を、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質の発現可能な条件下で培養することを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質の製造法、

(11) 第(7)項記載のCHO細胞または第(10)項記載の細胞膜画分から単離されることを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、

(12) 第(1)項または第(2)項記載のスクリーニング方法によって得られるヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩、

(13) 第(3)項または第(4)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られるヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩、

(14) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物がヒトMIP-1 α /RANTES受容体アンタゴニストである第(12)項または第(13)項記載のヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩、

(15) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物がヒトMIP-1 α /RANTES受容体アゴニストである第(12)項または第(13)項記載のヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩、

(16) 第(14)項記載のアンタゴニストあるいは第(15)項記載のアゴニストを含有することを特徴とする医薬、および、

(17) ウイルス性疾患、感染性疾患、腫瘍、アレルギー性疾患、炎症性疾患、糖尿病性疾患、中枢性疾患、高脂血症、高コレステロール血症、透析による血小板減少症、脊髄損傷、骨粗鬆症、潰瘍性大腸炎、消化性潰瘍、敗血症ショック、肺・心臓における再灌流障害、不安定狭心症、一過性脳虚血発作、心弁膜症、臓器移植後拒絶反応、血管形成術後再狭窄、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、腎不全、子宮内膜症、肺線維症、成人呼吸逼迫症候群の予防・治療剤である第(16)項記載の医薬に関する。

【0008】より具体的には本発明は、

(18) (i) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドを第(11)項記載のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に接触させた場合と、(ii) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドおよび被験化合物を同時に第(11)項記載のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に接触させた場合との比較を行うことを特徴とする第(1)項記載のヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(19) (i) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対する標識したリガンドを第(11)項記載のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に接触させた場合と、(ii) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対する標識したリガンドおよび被験化合物を同時に第(11)項記載のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に接触させた場合の該ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する標識したリガンドの結合量を比較することを特徴とする第(1)項記載のヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(20) (i) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドを第(7)項記載のCHO細胞または第(9)項記載の細胞膜画分に接触させた場合と、(ii) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドおよび被験化合物を同時

に第(7)項記載のCHO細胞または第(9)項記載の細胞膜画分に接触させた場合との比較を行うことを特徴とする第(2)項記載のヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(21) (i) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対する標識したリガンドを第(7)項記載のCHO細胞または第

(9)項記載の細胞膜画分に接触させた場合と、(ii) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対する標識したリガンドおよび被験化合物を同時に第(7)項記載のCHO細胞または第(9)項記載の細胞膜画分に接触させた場合の、該CHO細胞または該細胞膜画分に対する標識したリガンドの結合量を比較することを特徴とする第(2)項記載のヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(22) (i) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドを第(7)項記載のCHO細胞または第(9)項記載の細胞膜画分に接触させた場合と、(ii) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドおよび被験化合物を同時に第(7)項記載のCHO細胞または第(9)項記載の細胞膜画分に接触させた場合の、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体を介した細胞刺激活性(例えば細胞遊走、細胞内Ca²⁺濃度の変動、Gタンパク質の活性化、イノシトールリン脂質の産生、アラキドン酸の遊離、ヒスタミンなどの炎症性メディエーターの遊離、脱顆粒、細胞膜電位の変動、pHの変動、膜タンパク質あるいは細胞内タンパク質の活性化、膜タンパク質あるいは細胞内タンパク質のリン酸化などを促進あるいは抑制する活性など)を測定比較することを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体アンタゴニストのスクリーニング方法、

【0009】(23) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドを第(7)項記載のCHO細胞または第(9)項記載の細胞膜画分に接触させた場合の、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体を介した細胞刺激活性(例えば細胞遊走、細胞内Ca²⁺濃度の変動、Gタンパク質の活性化、イノシトールリン脂質の産生、アラキドン酸の遊離、cAMPの生成、ヒスタミンなどの炎症性メディエーターの遊離、脱顆粒、細胞膜電位の変動、pHの変動、膜タンパク質あるいは細胞内タンパク質の活性化、膜タンパク質あるいは細胞内タンパク質のリン酸化などを促進あるいは抑制する活性など)を測定することを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体アゴニストのスクリーニング方法、および

(24) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質が、配列番号: 2で表されるアミノ酸配列、配列番号: 2で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号: 2で表されるアミノ酸配列に1または2個以上のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、または配列番号: 2で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を有するタンパク質、またはそれらのタンパク質の分子内のアミノ酸の側鎖が適当な保護基(例

例えばホルミル基、アセチル基などのアシル基など)で保護されているタンパク質、もしくはそれらのタンパク質に糖鎖などが結合しているタンパク質である第(11)項記載のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を提供する。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明において、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAを保持する発現ベクターを作製する場合、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAとしては、例えばヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするcDNAやゲノムDNAなどが用いられているが、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質またはヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質と実質的に同等のリガンド結合活性を有する部分ペプチドをコードする塩基配列を有するものであれば、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば公知のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするcDNAやゲノムDNAなどを用いることができるが、合成DNAなどであってもよい。具体的には、配列番号:2で表されるアミノ酸配列を有するヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAが挙げられ、例えば配列番号:1で表される塩基配列を有するDNA(図1)などが用いられる。これらのDNAは、それ自体公知の遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。

【0011】発現ベクターとしては、例えばpAKKO-111、pAKKO-111H、pXT1、pRC/CMV、pRC/RSV、pcDNA1Neoなどが用いられ、なかでもpAKKO-111Hが好ましい。プロモーターとしては、宿主となる細胞で効率よく機能するものであれば何でもよく、SV40プロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーター、SR α プロモーター、RSVプロモーターなどが好ましく、特にSR α プロモーターが好ましい。発現ベクターには、以上の他にエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー等を含有しているものを用いるのが好ましい。選択マーカーとしては、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下DHFRまたはdhfrと略称する場合がある)遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子(G418耐性)などが挙げられ、なかでもDHFR遺伝子が好ましい。特に、選択マーカーとしてDHFR遺伝子を含有した発現ベクターをDHFR遺伝子を欠損したCHO細胞に導入した場合には、核酸を含まない培地で培養することによって形質転換体を選択できる。

【0012】本発明のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAを保持する発現ベクターとしては、具体的にはヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAの上流に前記のプロモーター(特に、SR α プロモーター、CMVプロモーター、RSVプロモーターなど)を挿入し、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAの下流にポリA付加シグナルを挿入し、その下流にDHFR遺伝子やネオマイシン耐性遺伝子などの選択マーカーを挿入し、さらにその下流にアンピシリン

耐性遺伝子を挿入したものなどが好ましい。より具体的には、例えば(図2)に示す方法で作製し得る発現ベクターであって、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAの上流にSR α プロモーターを挿入し、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAの下流にポリA付加シグナルを挿入し、その下流にDHFR遺伝子を挿入し、さらにその下流にアンピシリン耐性遺伝子を挿入したpCCRで標示される発現ベクター(実施例1)などが好適である。このようにして作製したヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAを保持する発現ベクターを宿主細胞に導入することによって、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAを高発現する細胞を作製することができる。

【0013】宿主細胞としてはCHO細胞(J. Exp. Med., 108: 945 (1995))などが好適である。さらに、CHO細胞のなかでも、特にDHFR遺伝子を欠損したCHO細胞(以下、CHO(dhfr⁻)細胞と略称する場合がある)(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216-4220 (1980))、CHO-K1細胞(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60: 1275 (1968))などが好ましい。特に、発現ベクター中にDHFR遺伝子を選択マーカーをして挿入する場合はCHO(dhfr⁻)細胞が好適である。この場合は、核酸を含まない培地で培養することによって形質転換体をきわめて容易に選択できる。CHO細胞は、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAを高発現させるだけでなく、著しく安定的に発現させることができる。発現ベクターと宿主細胞の組み合わせとしては適宜好ましい組み合わせを選択できる。例えばpCCRで標示される発現ベクター(実施例1)とCHO(dhfr⁻)細胞の組み合わせなどが好適である。宿主細胞への発現ベクターの導入方法としては、公知の方法、例えばリン酸カルシウム法(Virology, 52: 456-467 (1973))、電気穿孔法(EMBO J., 1: 841-845 (1982))等が用いられる。

【0014】ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を高発現する細胞は、まず上記の発現ベクターを導入した細胞を選択マーカーを指標として形質転換体を選択し、つづいてクローン選択を行うことにより、得ることができる。DHFR遺伝子を用いた場合メソトレキセート(MTX)の濃度を漸次増加して培養を継続することにより耐性細胞を選択し、これにより導入遺伝子を細胞内で増幅して、より高発現の細胞株を得ることもできる。ここで、宿主細胞としてたとえばヒトembryonic kidney 293などの細胞を用いる場合に比べて、CHO細胞を用いる場合は、発現ベクターの導入が著しく容易であり、また上記した形質転換体の選択においても非常に容易に行うことができるので有利である。なお、宿主としてCHO(dhfr⁻)細胞を用いた場合であっても、例えばpCCRで標示される発現ベクターはDHFR遺伝子を含むので、CCRで標示される発現ベクターを含有するCHO(dhfr⁻)細胞は、結果としてDHFR遺伝子を有している。本願明細書においては、DH

FR遺伝子を含有する発現ベクター（例えばpCCRなど）をCHO(dhfr⁻)細胞に導入して得られるCHO細胞を「CHO(dhfr⁻)」と表記する場合がある。

【0015】本発明において、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAを発現できるCHO細胞としては、例えば後述する実施例1で得られるpCCRで標示される発現ベクターをCHO(dhfr⁻)細胞に導入して得られるCHO(dhfr⁻)細胞、特にCHO/CCRで標示されるCHO細胞などが好適である。これらのCHO(dhfr⁻)細胞は、天然のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有する細胞（例えばヒト末梢血単球など）に比べて10-500倍のリガンド結合部位を有するものである。本発明のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターを含有する細胞を、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAの発現が可能な条件下で培養することによりヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を製造することができる。ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターを含有する細胞を培養する際、培地としては0.5-20%のウシ胎児血清を含むEMEM、DMEM、RPMI 1640、MEM- α などが挙げられる。特に、CHO(dhfr⁻)細胞および選択マーカーとしてDHFR遺伝子を含む発現ベクターを用いる場合、核酸を含まない透析ウシ胎児血清を含むDMEM培地あるいは核酸を含まない透析ウシ胎児血清を含む α -MEM培地を用いるのが好ましい。pHは約6-8であるのが好ましい。培養は通常約30-40℃で約15-200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌などを加える。

【0016】ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有する細胞膜画分とは、上記のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞をそれ自体公知の方法で破碎して得られる細胞膜を多く含む画分をいう。細胞の破碎方法としては、例えばPotter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎、凍結融解などが挙げられる。細胞膜を分画するには、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの方法が主として用いられる。例えば細胞破碎液を低速（500-3000rpm）で短時間（通常約1-10分）遠心し、上清をさらに高速（15000-30000 rpm）で通常約30分-2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質と細胞由来のリン脂質や膜タンパク質などの膜成分が多く含まれる。本発明のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有する細胞やその細胞膜画分中のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質の量は、1細胞あたり10³-10⁷分子であるのが好ましく、10⁴-10⁶分子であるのが好適である。

【0017】上記で得られたヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞からヒトMIP-1 α /RANTES

受容体タンパク質を単離するには、例えば下記の方法により行うことができる。ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞を培養後、公知の方法で細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波破碎、ホモジナイザー、凍結融解などによって細胞を破壊したのち、遠心分離や濾過により組換え型ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質の粗抽出液を得る。緩衝液の中に、PM SF(phenylmethanesulfonyl fluoride)、ペプスタチン、ロイペプチンなどのタンパク分解酵素阻害剤やCHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)、ジギトニン、トリトンX-100などの界面活性剤が含まれていてもよい。得られた抽出液中に含まれるヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を、自体公知の分離・精製方法を適切に組合わせて精製することができる。これらの公知の分離・精製方法として、塩析や溶媒沈澱などの溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、あるいはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動などの主として分子量の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、疎水クロマトグラフィーや逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【0018】かくして得られるヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を精製前または精製後に適当なタンパク修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。タンパク修飾酵素としては、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターを含有するCHO細胞を、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質の発現が可能な条件下で培養することにより製造され得るヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質は、天然型のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質と同質の活性を有するものである。実質的に同質の活性としては、例えばリガンド結合活性やシグナル伝達活性などが挙げられる。リガンド結合活性としては、MIP-1 α 、RANTES、MCP-3(J. Biol. Chem., 270: 16491-16494(1995))などとの結合活性が挙げられる。実質的に同質とは、リガンド結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、受容体タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

【0019】本発明のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質としては、例えば配列番号：2で表されるアミノ酸

配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質などが挙げられる。具体的には、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質の他、配列番号：2で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下）のアミノ酸が欠失したもの、配列番号：2で表されるアミノ酸配列に1または2個以上

（好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下）のアミノ酸が付加したもの、配列番号：2で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上

（好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたものなどが挙げられる。さらに、これらのヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質は、分子内のアミノ酸の側鎖が適当な保護基（例えばホルミル基、アセチル基などのアシル基など）で保護されていてもよいし、糖鎖などが結合していてもよい。本発明のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質の塩としては生理学的に許容される塩基

（例、アルカル金属等）や酸（有機酸、無機酸）との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸

（例えば塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0020】本発明のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質の部分ペプチドとしては、例えばヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質の分子のうち、疎水性プロット解析から推定される疎水性領域や親水性領域の1つあるいは複数の領域を含む部分ペプチドである。これらの部分ペプチドは1つの疎水性領域の一部あるいは全部を含んでいてもよいし、1つの親水性領域の一部あるいは全部を含んでいてもよい。本発明のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質の部分ペプチドの塩としては、上記した本発明のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質の塩と同様のものが用いられる。

【0021】本発明のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチド合成法に従って、あるいは本発明のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチド合成法としては、たとえば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば以下の(a)～(e)に記載された方法が挙げられる。

(a) M. Bodanszky および M. A. Ondetti, ペプチドシンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

(b) Schroeder および Luebke, ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

(c) 泉屋信夫、ペプチド合成の基礎と実験、丸善（株）（1975年）

(d) 矢島治明および榊原俊平、生化学実験講座1、タンパク質の化学IV, 205, (1977年)

10 (e) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店（1991年）

また反応後は通常精製法、例えば溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、再結晶などを組合わせて本発明の部分ペプチドを単離精製することができる。上記の方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換できるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換できる。

【0022】本発明のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞(CHO/CCR)もしくは該CHO細胞から得られるヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有する細胞膜画分、またはそれより単離して得られるヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩はヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。該スクリーニングに用いられるヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質は、組換え型、天然型のいずれであっても使用し得る。上記、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物には、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体アンタゴニストおよびヒトMIP-1 α /RANTES受容体アゴニストが含まれる。すなわち、本発明は、(1) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩と被験化合物とを接触させることを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニング方法、および(2) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞または該細胞膜画分と被験化合物とを接触させることを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。具体的には、本発明は、

40 (1) (i) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドをヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に接触させた場合と、(ii) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドおよび被験化合物を同時にヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に接触させた場合との比較を行うことを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

50 (2) (i) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドを、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有する

CHO細胞または該細胞膜面分と接触させた場合と、(i) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドおよび被験化合物を同時にヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞または該細胞膜面分と接触させた場合との比較を行うことを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0023】より具体的には、本発明のスクリーニング方法において(i)と(ii)の場合に、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、またはヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞あるいは該細胞膜面分に対するヒトMIP-1 α /RANTES受容体のリガンドの結合量、もしくはリガンドによる細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。すなわち、本発明は、

(1a) (i) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対する標識したリガンドを、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に接触させた場合と、(ii) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドおよび被験化合物を同時に、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に接触させた場合の、該受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する標識したリガンドの結合量を比較することを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(1b) (i) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対する標識したリガンドを、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞または該細胞膜面分に接触させた場合と、(ii) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドおよび被験化合物を同時に、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞または該細胞膜面分に接触させた場合の、該CHO細胞または該細胞膜面分に対する標識したリガンドの結合量を比較することを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0024】(2b) (i) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドを、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞または該細胞膜面分と接触させた場合と、(ii) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドおよび被験化合物を同時に、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞または該細胞膜面分と接触させた場合の、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体を介した細胞刺激活性(例えば細胞遊走、細胞内Ca²⁺濃度の変動、Gタンパク質の活性化、イノシトールリン脂質の産生、アラキドン酸の遊離、cAMPの生成、ヒスタミンなどの炎症性メディエーターの遊離、脱顆粒、細胞膜電位の変動、pHの変動、膜タンパク質あるいは細胞内タンパク質の活性化、膜タンパク質あるいは細胞内タンパク質のリン酸化などを促進あるいは抑制する活性など)を測定することを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体アン

タゴニストのスクリーニング方法、および、

(3b) ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドを、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞または該細胞膜面分と接触させた場合の、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体を介した細胞刺激活性(例えば細胞遊走、細胞内Ca²⁺濃度の変動、Gタンパク質の活性化、イノシトールリン脂質の産生、アラキドン酸の遊離、cAMPの生成、ヒスタミンなどの炎症性メディエーターの遊離、脱顆粒、細胞膜電位の変動、pHの変動、膜タンパク質あるいは細胞内タンパク質の活性化、膜タンパク質あるいは細胞内タンパク質のリン酸化などを促進あるいは抑制する活性など)を測定することを特徴とするヒトMIP-1 α /RANTES受容体アゴニストのスクリーニング方法を提供する。

10

20

30

40

50

【0025】上記の(1a)または(1b)のスクリーニング方法において、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、またはヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞もしくは該細胞膜面分と結合することにより、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドとヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、またはヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有する該CHO細胞もしくは該細胞膜面分との結合を阻害する化合物をヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩の候補化合物として選択することができる。また、上記の(2b)のスクリーニング方法において、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドとヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞または該細胞膜面分との結合を阻害するが、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体を介した細胞刺激活性(例えば細胞遊走、細胞内Ca²⁺濃度の変動、Gタンパク質の活性化、イノシトールリン脂質の産生、アラキドン酸の遊離、cAMPの生成、ヒスタミンなどの炎症性メディエーターの遊離、脱顆粒、細胞膜電位の変動、pHの変動、膜タンパク質あるいは細胞内タンパク質の活性化、膜タンパク質あるいは細胞内タンパク質のリン酸化などを促進あるいは抑制する活性など)を有しない化合物をヒトMIP-1 α /RANTES受容体アンタゴニストとして選択することができる。さらに、上記の(3b)のスクリーニング方法において、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に結合し、該受容体を介した細胞刺激活性(例えば細胞遊走、細胞内Ca²⁺濃度の変動、Gタンパク質の活性化、イノシトールリン脂質の産生、アラキドン酸の遊離、cAMPの生成、ヒスタミンなどの炎症性メディエーターの遊離、脱顆粒、細胞膜電位の変動、pHの変動、膜タンパク質あるいは細胞内タンパク質の活性化、膜タンパク質あるいは細胞内タンパク質のリン酸化などを促進あるいは抑制する活性など)を有する化合物をヒトMIP-1 α /RANTES受容体アゴニストとして選択することができる。

【0026】本発明のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンバ

ク質を含有するCHO細胞が得られる以前は、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を持続的に高発現できる動物細胞がなかったため、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニングを効率よく行うことができなかった。本発明のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞は、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を大量にかつ安定的に発現し、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニングに有用である。以下に本発明のスクリーニング方法を具体的に説明する。本発明のスクリーニング方法において、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞を用いる場合は、該CHO細胞を生細胞のまま

用いることができる。あるいは、該CHO細胞をそれ自体公知の方法に従ってグルタルアルデヒド、パラホルムアルデヒドなどで固定化した後、用いることもできる。
【0027】本発明のスクリーニング方法において使用されるヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドとしては、例えばMIP-1 α 、RANTES、MCP-3などが挙げられる。ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対する標識したリガンドとしては、たとえば¹²⁵I、³⁵S、³H、¹⁴Cなどで標識した上記のリガンドなどを用いることができる。あるいは、フルオレッセインなどで蛍光標識したリガンド、または西洋ワサビペルオキシダーゼなどで酵素標識したリガンド、あるいはリガンドとアルカリフォスファターゼなどのタンパク質との遺伝子工学的に作製した融合タンパク質を用いることもできる。あるいは、MIP-1 α 、RANTES、MCP-3などのリガンドの部分アミノ酸配列を有するペプチドを用いることもできる。これらの標識体は自体公知の方法に従って作製することができる。例えば¹²⁵Iで標識されたMIP-1 α およびRANTESがDu Pontより市販されているので、それらを利用できる。本発明のスクリーニング方法で使用される被験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、微生物発酵生産物、海洋生物抽出液、植物抽出液、細胞抽出液、動物組織抽出液などが挙げられる。これらの被験化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0028】具体的には、上記の(1a)または(1b)のスクリーニング方法を実施するには、まず、本発明のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、またはヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞あるいは該細胞膜面分を、スクリーニングに適した緩衝液に懸濁することにより受容体標品を調製する。緩衝液としては、リガンドと受容体との結合を阻害しないものであれば何でもよく、例えばpH 6-8のリン酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液、PBS、HBSSなどが用いられる。また、非特異的結合を低減させる目的で、ウシ血清アルブミンなどのタンパク質、CHAPSやTween 80TM（花王-アトラス社）、ジギトニンなどの界面活性剤を加えることもできる。さら

に、タンパク質分解酵素によるヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質の分解を抑えるために、PMSF、ペプスタチン、ロイペプチンなどのタンパク質分解酵素阻害剤を添加することもできる。また、組換え型ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞を培養器に接着させたままスクリーニングに用いることもできる。約0.01-10 mlの該受容体発現細胞または該受容体標品に、一定量（約5,000-1,000,000 cpm）の標識体と約10⁻³-10⁻¹⁰ Mの濃度の合成化合物などの被験化合物あるいは適宜に希釈した微生物発酵生産物などの被験化合物とを同時に添加し、約0-50℃（望ましくは約4-37℃）で、約0.5-24時間（望ましくは約0.5-3時間）反応させる。反応後、適量の緩衝液で洗浄したのち該受容体発現細胞または該受容体標品に残存する放射線量をガンマカウンター、液体シンチレーションカウンターなどで測定する。反応時に大過剰の非標識リガンドを共存させたときの残存放射線量を非特異的結合量とする。あるいは、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有しないコントロールのCHO細胞または該細胞膜面分を用いたときの残存放射線量を非特異的結合量とすることもできる。共存物のないときの残存放射線量を総結合量とすると、総結合量から非特異的結合量を差し引いた値が特異的結合量である。反応液に添加することにより、この特異的結合量を低下させる被験化合物をヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩の候補化合物として選択することができる。

【0029】また、上記(2b)または(3b)のスクリーニング方法を実施するためには、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体を介した細胞刺激活性（例えば細胞遊走、細胞内Ca²⁺濃度の変動、Gタンパク質の活性化、イノシトールリン脂質の産生、アラキドン酸の遊離、cAMPの生成、ヒスタミンなどの炎症性メディエーターの遊離、脱顆粒、細胞膜電位の変動、pHの変動、膜タンパク質あるいは細胞内タンパク質の活性化、膜タンパク質あるいは細胞内タンパク質のリン酸化などを促進あるいは抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、本発明のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞を培養後、細胞懸濁液を調製し、ケモタキシスチャンバーを用いてリガンドに応答した該CHO細胞の遊走活性を測定できる。あるいは、該CHO細胞懸濁液にfura-2やfura-PE3などの蛍光指示薬を添加することによりCHO細胞にこれらの蛍光指示薬を負荷し、蛍光分光光度計などを用いてリガンドの刺激による細胞内Ca²⁺濃度の変動を測定できる。

【0030】本発明のスクリーニング用キットは、本発明のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、または本発明のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞もしくは該細胞膜面分を含有するものである。本発明のスクリーニ

ング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

〔スクリーニング用試薬〕

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

DMEM (GIBCO BRL) に、0.5%のウシ血清アルブミン (Sigma) を加えたもの。孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質標品

ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞を、96ウェルマイクロプレートに5 \times 10⁴個/ウェルで継代し、37℃、5%CO₂、95%airで1日間培養したもの。

③ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対する標識したリガンド
ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対する市販の [¹²⁵I] など標識したリガンド (例えば、MIP-1 α , RANTES, MCP-3など) 溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて0.5-1.0nMに希釈する。

④ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドの標準液
ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンド (例えば、MIP-1 α , RANTES, MCP-3など) をDMEM/0.5%BSAで10 μ Mとなるように溶解し、-80~-20℃で保存する。

【0031】〔測定法〕

①96ウェルマイクロプレートにてヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質を含有するCHO細胞を培養し、培地を除いた後、35 μ l/wellのDMEM/0.5%BSAを添加する。

②10⁻³~10⁻¹⁰Mの被験化合物溶液を5 μ l/well加えた後、0.5-1.0nM標識リガンド (例えば、MIP-1 α , RANTES, MCP-3など) を10 μ l/well加え、室温にて30~40分間反応させる。非特異的結合量を知るためには被験化合物のかわりに0.5~1.0 μ Mの非標識リガンド (例えば、MIP-1 α , RANTES, MCP-3など) を10 μ l/well加えておく。

③反応液を除去し、200 μ l/wellのPBSで2回洗浄する。25 μ l/wellのエタノールを添加して攪拌する。さらに、200 μ l/wellのシンチレーター (MicroScint-20, Packard) を添加して攪拌する。

④細胞に結合した放射活性をTopCount (Packard) で測定し、Percent of Maximum Binding (PMB) を次の式

〔数1〕で求める。

【0032】

〔数1〕

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

PMB: Percent of Maximum Binding

B: 検体を加えた時の値

NSB: Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀: 最大結合量

【0033】本発明のスクリーニング方法またはスクリー

ーニング用キットを用いて得られるヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩は、該スクリーニング方法または該スクリーニング用キットを用いて被験化合物 (例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、微生物発酵生産物、海洋生物抽出液、植物抽出液、細胞抽出液、動物組織抽出液などが挙げられる。これらの被験化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。) の中から選択される化合物またはその塩である。被験化合物は、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、微生物発酵生産物、海洋生物抽出液、植物抽出液、細胞抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。これらのヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩は、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対するリガンドとヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質との結合を阻害する化合物である。該化合物には、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体を介した細胞刺激活性を有しない化合物 (ヒトMIP-1 α /RANTES受容体アンタゴニスト) と該細胞刺激活性を有する化合物 (ヒトMIP-1 α /RANTES受容体アゴニスト) またはそれらの塩が含まれる。本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる該ヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物の構造式の一部を、付加、欠失あるいは置換などにより変換される化合物なども本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られるヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物に含まれる。該ヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物の塩としては、生理学的に許容される塩基塩又は酸付加塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸 (例えば塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸) との塩、あるいは有機酸 (例えば酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸) との塩などが用いられる。

【0034】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られるヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩、すなわち、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体アンタゴニストあるいはヒトMIP-1 α /RANTES受容体アゴニストは、安全で毒性のない化合物であり、種々のウイルス性疾患あるいは感染性疾患 (例えば、急性ウイルス性脳炎、急性バクテリア性髄膜炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肺炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘-帯状疱疹ウイルス感染症、エイズ感染症、インフルエンザ感染症、侵襲性ブドウ球菌感染症、結核など)、腫瘍 (例えば、膀胱ガン、乳ガン、子宮けいガン、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、大腸ガン、多発性骨髄腫、悪性骨髄腫、前立腺ガン、肺ガン、胃ガン、ホジキ

ン病など)、アレルギー性疾患(例えば、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎など)、炎症性疾患(例えば、動脈硬化症、心臓移植後に発症する動脈硬化、(慢性)関節リウマチ、腎炎など)、糖尿病性疾患(例えば、糖尿病、糖尿病性腎症、糖尿病性合併症、糖尿病性網膜症、糖尿病性網膜炎、糖尿病性細小血管症など)、中枢性疾患(例えば、アルツハイマー病、てんかん、発熱、疼痛、痴呆など)、高脂血症、高コレステロール血症、透析による血小板減少症、脊髄損傷、骨粗鬆症、潰瘍性大腸炎、消化性潰瘍、敗血症(ショック)、肺・心臓における再灌流障害、不安定狭心症、一過性脳虚血発作、心弁膜症、臓器移植後拒絶反応、血管形成術後再狭窄、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、腎不全、子宮内膜症、肺線維症、成人呼吸逼迫症候群などの予防・治療剤として有用である。また、本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られるヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩は、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体に結合することができるので、受容体発現細胞や生体内におけるヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質の検出または定量用の試薬としても有用である。

【0035】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られるヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩をヒトやほ乳哺乳動物(マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジーなど)の医薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば該化合物またはその塩を生理学的に認められる単体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量がえられるようにするものである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのようない賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのようない潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのようない甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状単体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁

させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

【0036】注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど)などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール(例えばエタノール)、ポリアルコール(例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤(例えばポリソルベート80(TM)、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えばベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物(例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジー、ヒトなど)に対して投与することができる。該ヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(体重60 kgとして)においては、1日あたり約0.1から100 mg、好ましくは約1.0から50 mg、より好ましくは約1.0から20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人(体重60 kgとして)においては、1日あたり約0.01から30 mg、好ましくは約0.1から20 mg、より好ましくは約0.1から10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0037】本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemistry Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を以下に示す。またアミノ酸に関して光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸

【0038】

GあるいはGly	: グリシン
----------	--------

21

AあるいはAla	: アラニン
VあるいはVal	: バリン
LあるいはLeu	: ロイシン
IあるいはIle	: イソロイシン
SあるいはSer	: セリン
【0039】	
TあるいはThr	: スレオニン
CあるいはCys	: システイン
MあるいはMet	: メチオニン
EあるいはGlu	: グルタミン酸
DあるいはAsp	: アスパラギン酸
KあるいはLys	: リシン
RあるいはArg	: アルギニン
HあるいはHis	: ヒスチジン
FあるいはPhe	: フェニルアラニン
YあるいはTyr	: チロシン
WあるいはTrp	: トリプトファン
PあるいはPro	: プロリン
NあるいはAsn	: アスパラギン
QあるいはGln	: グルタミン
B S A	: ウシ血清アルブミン
F B S	: ウシ胎児血清
S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム
CHO	: チャイニーズハムスター卵巣細胞
D MEM	: ダルベッコ変法イーグル培地
P B S	: リン酸緩衝生理食塩水

【0040】後述の実施例1で得られたプラスミドpCCRを保持する形質転換体エシエリヒアコリ(*Escherichia coli*) JM109/pCCRは、平成7年12月19日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERM BP-5342として寄託されている。また、後述の実施例2で得られたCHO/CCRは平成7年12月19日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERM BP-5343として寄託されている。

【0041】本願明細書の配列表における各配列番号について以下に説明する。

〔配列番号：1〕ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質をコードするDNAの塩基配列を表す。

〔配列番号：2〕ヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質のアミノ酸配列を表す。

【0042】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2nd ed. J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press)に記載されている方法に従った。

【0043】

22

【実施例1】ヒトMIP-1 α /RANTES受容体発現ベクターの構築

PCR法によりhuman gland cDNA library (U-937 cells activated by PMA, Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA) からNeoteらの報告(Cell 72: 415 - 425 (1993))のKpn I (392)~Hinc II(886)に相当する約500 bpのDNA断片を得た。これをプローブとしてヒトMIP-1 α /RANTES受容体cDNAを得て、 λ gt11のEco RI部位にクローン化した。Neoteらの報告(Cell 72: 415-425 (1993))では未発表であった5'側の非翻訳領域の塩基配列を決定し、5'側-30の位置にTthIII I サイトがあることを見出した。また、翻訳領域の全塩基配列を決定しNeoteらの報告(Cell 72: 415-425 (1993))と完全に一致していることを確認した。なお、塩基配列の決定は全て蛍光DNAシーケンサー(Model 373A, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA)により行った。クローン化されたヒトMIP-1 α /RANTES受容体cDNAを、以下のようにして動物細胞発現用ベクターであるpAKKO-111HのSal IおよびNhe I部位に導入し、プラスミドpCCRを構築した〔図2〕。まず、上記の λ gt11をEco RIで処理することにより2つの断片を得た。これらをpUC19(宝酒造、京都)のEco RI部位に導入し、プラスミドpCR1とプラスミドpCR2を得た。次に、5'側と3'側の非翻訳領域に切断部位がある制限酵素TthIII IとBst XIを用いてpCR1とpCR2の一方のEco RI部位を削除した。非翻訳領域のEco RI部位を削除したこれら2つのプラスミドをSal I-Eco RIおよびXba I-Eco RIで消化することにより、2つのDNA断片を得た。これらをpAKKO-111HのSal IとNhe I部位に導入してpCCRを得た。

【0044】

【実施例2】ヒトMIP-1 α /RANTES受容体発現CHO細胞株の樹立

ヒトMIP-1 α /RANTES受容体発現プラスミドpCCRをリン酸カルシウム法によりCHO(dhfr⁻)細胞へ導入した。この導入はCellPfect transfection kit (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)を用いて添付説明書に従って行った。CHO(dhfr⁻)細胞を直径10 cmのシャーレに1x10⁶ cells/10 ml/dishでまき、核酸(+)の非選択培地(10%透析FBS(GIBCO BRL, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA)/MEM- α with RNA and DNA (GIBCO BRL))で24時間培養した。これらのシャーレに塩化セシウムによる精製を2回繰り返して得られたpCCR DNA (10 μ g/dish)とリン酸カルシウムの共沈懸濁物を均一に一滴ずつ落した。CO₂インキュベーターで37℃、0.5% CO₂の条件下で6時間培養した後、非選択培地で2回洗浄し、10ml/dishの非選択培地を加えて2日間さらに培養した。その後、核酸(-)の選択培地(10%透析FBS/MEM- α without RNA and DNA (GIBCO BRL))にて4倍に拡大し培養を続けた。3日ごとにフレッシュな選択培地に交換した。選択培地での培養10日後に肉眼でコロニーが確認できた。

さらに4日後にそれらのコロニー (dhfr⁺に形質転換した細胞) を拾った。dhfr⁺に形質転換した120のコロニーに対する¹²⁵I-RANTES (Du Pont Company, Wilmington, DE, USA) の結合量を調べ、結合量の多いコロニーを限界希釈法により再コロニー化し、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体を高発現している細胞株CHO/CCRを得た。

【0045】

【実施例3】結合アッセイによるヒトMIP-1 α /RANTES受容体発現の確認

¹²⁵I-RANTESおよび¹²⁵I-MIP-1 α (Du Pont Company) を用いた結合アッセイを以下に行った。96 ウェルマイクロプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) に 5 x 10⁴ / 100 μ l / well のCHO/CCR細胞またはベクタープラスミドpAKKO-111HをトランスフェクトしたCHO細胞 (mock transfectants) をまき24 時間培養した。培地を除き、DMEM/ 0.5 % BSA で希釈した5 nMの¹²⁵I-RANTESあるいは¹²⁵I-MIP-1 α を50 μ l / well 加え、室温で30分間インキュベートした。その後200 μ l / well のPBSで2回洗浄し、100 μ l / well の0.1 N-NaOH / 1 % SDSを加えて細胞に結合したリガンドを溶出した。結合量の測定は γ -カウンター (Cobra II, Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA) で行った。図3はCHO/CCR細胞に対する¹²⁵I-RANTESの結合を、また図4は¹²⁵I-MIP-1 α の結合をそれぞれ示す。これに対して、mock transfectantsに対する結合量はいずれも低値であった。これらの結果から、CHO/CCR細胞でのヒトMIP-1 α /RANTES受容体の発現が確認された。

【0046】

【実施例4】種々の CC ケモカインに対するヒトMIP-1 α /RANTES受容体発現CHO細胞 (CHO/CCR細胞) の遊走

96ウェルマイクロケモタキシスチャンバー (NeuroProbe, Inc., Cabin John, MD, USA) を用いて遊走アッセイを行った。ポアサイズ 5 μ m のポリカーボネートフレームフィルター (NeuroProbe) を、PBSで希釈した10 μ g/mlのウシフィブロネクチン溶液に室温で10分間浸漬したのち風乾することにより前処理を施した。下室にDMEM/0.5% BSAに溶解した 37 μ lの 種々の濃度の CC ケモカイン (RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MCP-1 (いずれもPepro Tech)) を添加し、上室に1 x 10⁶ cells/mlのCHO/CCR細胞を200 μ l 添加して、37℃で4時間インキュベートした。フィルター下面に遊走したCHO/CCR細胞をDiff-Quick (国際試薬, 神戸) で固定染色し、プレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) で595 nmの吸光度を測定した。いずれの測定値も2ウェルの平均値を示した。図5に示すように、CHO/CCR細胞はmock transfectantsに比較して 50 nM RANTESに反応して明らかに遊走することがわかった。RANTESに反応したCHO/CCR細胞の遊走はRANTESの濃度に依存し、さらにMIP-1 α に対しても濃度依存的に遊走した。しかしながら、MIP-1 β やMCP-1に対しては遊走しなかった (図6)。

【0047】

【実施例5】CHO/CCR細胞による細胞内Ca²⁺アッセイ

CHO/CCR細胞をmodified Gey's buffer (MGB) (5 mM KCl, 147 mM NaCl, 0.22 mM KH₂PO₄, 1.1 mM Na₂HPO₄, 5.5 mM glucose, 0.3 mM MgSO₄, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4) で2回洗浄したのち、5 x 10⁵/ml になるようにMGBに懸濁した。蛍光指示薬であるfura-PE3/AM (Teflabs, Austin, TX, USA) を終濃度2 μ Mになるように添加して室温で30分間放置することにより細胞内に取り込ませた。1 mM CaCl₂を含むMGBで2回洗浄したのち、5 x 10⁵/mlになるように1 mM CaCl₂を含むMGBに懸濁した。細胞内Ca²⁺濃度の測定はF-2000分光蛍光光度計 (日立製作所、東京) で行った。CHO/CCR細胞を100 nM RANTESで刺激することにより、細胞内Ca²⁺濃度の一過性の上昇が観察された。この上昇はmock transfectantsではみられなかった (図7)。CHO/CCR細胞は、RANTESのみならず MIP-1 α にも反応して細胞内Ca²⁺濃度が一過性に上昇したが、MIP-1 β に対する反応性は低く、MCP-1にはほとんど反応しなかった (図8)。

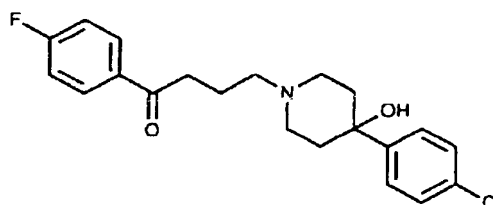
【0048】

【実施例6】ヒトMIP-1 α /RANTES受容体発現CHO細胞 (CHO/CCR細胞) を用いた¹²⁵I-RANTES 結合阻害化合物のスクリーニング

96 ウェルマイクロプレート (CulturPlate, Packard) に CHO/CCR細胞を 5 x 10⁴ /100 μ l/well でまき 24 時間培養した。培地を除いた後、35 μ l/wellのDMEM/0.5 % BSA、ついでDMEM/0.5 % BSA で希釈した 被験化合物を5 μ l/well、さらに10 μ l/well の ¹²⁵I-RANTES (終濃度 100 - 200 pM) を順次添加し、室温で 30 ~ 40 分間インキュベートした。その後 200 μ l/well の PBS で2回洗浄し、25 μ l/well のエタノールを添加して攪拌した。さらに 200 μ l/well のシンチレーター (MicroScint-20, Packard) を添加して攪拌したのち、細胞に結合した¹²⁵I-RANTESの放射活性をTopCount (Packard) で測定した。被験化合物を添加しない場合の結合量を100%、ベクタープラスミドpAKKO-111HをトランスフェクトしたCHO細胞 (mock transfectants) への結合を0%とし、¹²⁵I-RANTESの結合を50%阻害する濃度 (IC₅₀値) を求めた。上記の方法で種々の化合物のスクリーニングを行った結果、精神分裂病および躁病の治療薬であるハロペリドール (haloperidol)

【0049】

【化1】



【0050】がCHO/CCR細胞に対する¹²⁵I-RANTESの結合

を阻害することを見出した。ハロペリドールはCHO/CCR細胞に対する¹²⁵I-MIP-1 α の結合をも阻害した。そのIC₅₀値はそれぞれ2 μ Mおよび4 μ Mであった〔表1〕。

*

化合物	結合アッセイ		遊走アッセイ	
	リガンド	IC ₅₀	リガンド	IC ₅₀
ハロペリドール	¹²⁵ I-RANTES	2 μ M	RANTES	2 μ M
	¹²⁵ I-MIP-1 α	4 μ M		

【0052】

【実施例7】 ヒトMIP-1 α /RANTES受容体発現CHO細胞（CHO/CCR細胞）の遊走アッセイにおけるハロペリドールの阻害活性

実施例4に述べた方法により、RANTESに対するCHO/CCR細胞の遊走アッセイにおけるハロペリドールの阻害活性を調べた。下室にはDMEM/0.5% BSAに溶解した37 μ lの40 nMの RANTESを添加し、上室にまずDMEM/0.5 % BSAで希釈した種々の濃度のハロペリドール 100 μ lを添加し、ついで2 x 10⁶ cells/mlのCHO/CCR細胞を100- μ l添加して、37℃で4時間インキュベートした。フィルター下面に遊走したCHO/CCR細胞をDiff-Quickで固定染色し、プレートリーダーで595 nm の吸光度を測定した。いずれの測定もduplicateで行った。下室に40 nMの濃度のRANTESを添加し上室にハロペリドールを添加しない場合の吸光度を100%、下室にDMEM/0.5 % BSAのみを添加し上室にハロペリドールを添加しない場合の吸光度を0%として、CHO/CCR細胞の遊走を50%阻害する濃度（IC₅₀値）を求めた。〔表1〕に示したように、ハロペリドールのIC₅₀値は2 μ Mであった。

【0053】

【実施例8】 ヒトMIP-1 α /RANTES受容体発現CHO細胞（CHO/CCR細胞）による細胞内Ca²⁺アッセイにおけるハロペリドールの阻害活性

実施例5に述べた方法により、細胞内Ca²⁺アッセイにおけるハロペリドールの阻害活性を調べた。すなわち、CHO/CCR細胞懸濁液に10 μ Mのハロペリドールを添加し、その150秒後に10 nMのRANTESを添加して、RANTESの誘因する細胞内Ca²⁺濃度の上昇に対するハロペリドールの作用を調べた。その結果、ハロペリドール無添加時の細胞内Ca²⁺濃度上昇のピーク濃度を100%とした時、10 μ Mのハロペリドール添加によりそのピーク濃度は31%にまで低下した。さらに、10 μ Mのハロペリドールの添加のみでは、胞内Ca²⁺濃度上昇の一過性の上昇は認められなかった。この結果は、実施例6および実施例7の結果とともに、ハロペリドールはヒトMIP-1 α /RANTES受容体に対してアゴニストとして作用せず、アンタゴニストとして作用することを示す。また、ハロペリドールはヒトMIP-1 α /RANTES受容体のリガンドであるならばRANTESやMIP-1 α など種類を問わずその活性を阻害することを示す。

【0054】

* 【0051】

【表1】

【発明の効果】 本発明のヒトMIP-1 α /RANTES受容体タンパク質またはその部分ペプチドもしくはそれらの塩、またはヒトMIP-1 α /RANTES受容体を有するCHO細胞もしくは該細胞膜画分を用いて、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体親和性化合物またはその塩のスクリーニングを行うことができる。したがって、種々のウイルス性疾患あるいは感染性疾患（例えば、急性ウイルス性脳炎、急性バクテリア性髄膜炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肺炎、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘-帯状疱疹ウイルス感染症、エイズ感染症、インフルエンザ感染症、侵襲性ブドウ球菌感染症、結核など）、腫瘍（例えば、膀胱ガン、乳ガン、子宮けいガン、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、大腸ガン、多発性骨髄腫、悪性骨髄腫、前立腺ガン、肺ガン、胃ガン、ホジキン病など）、アレルギー性疾患（例えば、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎など）、炎症性疾患（例えば、動脈硬化症、心臓移植後に発症する動脈硬化、（慢性）関節リウマチ、腎炎など）、糖尿病性疾患（例えば、糖尿病、糖尿病性腎症、糖尿病性合併症、糖尿病性網膜症、糖尿病性網膜炎、糖尿病性細小血管症など）、中枢性疾患（例えば、アルツハイマー病、てんかん、発熱、疼痛、痴呆など）、高脂血症、高コレステロール血症、透析による血小板減少症、脊髄損傷、骨粗鬆症、潰瘍性大腸炎、消化性潰瘍、敗血症（ショック）、肺・心臓における再灌流障害、不安定狭心症、一過性脳虚血発作、心弁膜症、臓器移植後拒絶反応、血管形成術後再狭窄、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、腎不全、子宮内膜症、肺線維症、成人呼吸逼迫症候群などの予防・治療剤を早期に提供できる。また、本発明のヒトMIP-1 α /RANTES受容体を含有するCHO細胞（CHO/CCR細胞）は、ヒトMIP-1 α /RANTES受容体を安定的に高発現できる細胞である。

【0055】

【配列表】

【配列番号：1】

配列の長さ：1065

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

50 配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

```

ATGGAAGCTC CAAACACCAC AGAGGACTAT GACACGACCA CAGAGTTTGA CTATGGGGAT   60
GCAACTCCGT GCCAGAAGGT GAACGAGAGG GCCTTTGGGG CCCAAGTGCT GCGCCCTCTG   120
TACTCCTTGG TATTTGTCAT TGGCCTGGTT GGAAACATCC TGGTGGTCCT GGTCTTGTG   180
CAATACAAGA GGCTAAAAAA CATGACCAGC ATCTACCTCC TGAACCTGGC CATTTCTGAC   240
CTGCTCTTCC TGTTCACGCT TCCCTTCTGG ATCGACTACA AGTTGAAGGA TGAAGGGTT   300
TTTGGTGATG CCATGTGTAA GATCCTCTCT GGGTTTATT ACACAGGCTT GTACAGCGAG   360
ATCTTTTTCA TCATCCTGCT GACGATTGAC AGGTACCTGG CCATCGTCCA CGCCGTGTTT   420
GCCTTGCGGG CACGGACCGT CACTTTTGGT GTCATCACCA GCATCATCAT TTGGGCCCTG   480
GCCATCTTGG CTTCATGCC AGGCTTATAC TTTTCCAAGA CCCAATGGGA ATTCACTCAC   540
CACACCTGCA GCCTTCACCT TCCTCAGGAA AGCCTACGAG AGTGAAGCT GTTTCAGGCT   600
CTGAACTGA ACCTCTTGG GCTGGTATTG CCTTTGTTGG TCATGATCAT CTGCTACACA   660
GGGATTATAA AGATTCTGCT AAGACGACCA AATGAGAAGA AATCCAAAGC TGTCGGTTTG   720
ATTTTTGTCA TCATGATCAT CTTTTTCTC TTTTGGACCC CCTACAATT GACTATACTT   780
ATTCTGTGTT TCCAAGACTT CCTGTTACC CATGAGTGTG AGCAGAGCAG ACATTTGGAC   840
CTGGCTGTGC AAGTGACGGA GGTGATCGCC TACACGCACT GCTGTGTCAA CCCAGTGATC   900
TACGCCTTCG TTGGTGAGAG GTTCCGGAAG TACCTGCGGC AGTTGTTCCA CAGGCGTGTG   960
GCTGTGCACC TGGTTAAATG GCTCCCTTC CTCTCCGTGG ACAGGCTGGA GAGGGTCAGC 1020
TCCACATCTC CCTCCACAGG GGAGCATGAA CTCTCTGCTG GGTTC   1065

```

【0056】

【配列番号：2】

配列の長さ：355

* 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：ペプチド

配列

```

Met Glu Thr Pro Asn Thr Thr Glu Asp Tyr Asp Thr Thr Thr Glu Phe
  1             5             10            15
Asp Tyr Gly Asp Ala Thr Pro Cys Gln Lys Val Asn Glu Arg Ala Phe
          20             25            30
Gly Ala Gln Leu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Val Ile Gly
          35             40            45
Leu Val Gly Asn Ile Leu Val Val Leu Val Leu Val Gln Tyr Lys Arg
          50             55            60
Leu Lys Asn Met Thr Ser Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp
          65             70            75            80
Leu Leu Phe Leu Phe Thr Leu Pro Phe Trp Ile Asp Tyr Lys Leu Lys
          85             90            95
Asp Asp Trp Val Phe Gly Asp Ala Met Cys Lys Ile Leu Ser Gly Phe
          100            105            110
Tyr Tyr Thr Gly Leu Tyr Ser Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr
          115            120            125
Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Arg Ala
          130            135            140
Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Ile Thr Ser Ile Ile Ile Trp Ala Leu
          145            150            155            160
Ala Ile Leu Ala Ser Met Pro Gly Leu Tyr Phe Ser Lys Thr Gln Trp
          165            170            175
Glu Phe Thr His His Thr Cys Ser Leu His Phe Pro His Glu Ser Leu
          180            185            190
Arg Glu Trp Lys Leu Phe Gln Ala Leu Lys Leu Asn Leu Phe Gly Leu
          195            200  50            205

```

29 30

Val Leu Pro Leu Leu Val Met Ile Ile Cys Tyr Thr Gly Ile Ile Lys
210 215 220

Ile Leu Leu Arg Arg Pro Asn Glu Lys Lys Ser Lys Ala Val Arg Leu
225 230 235 240

Ile Phe Val Ile Met Ile Ile Phe Phe Leu Phe Trp Thr Pro Tyr Asn
245 250 255

Leu Thr Ile Leu Ile Ser Val Phe Gln Asp Phe Leu Phe Thr His Glu
260 265 270

Cys Glu Gln Ser Arg His Leu Asp Leu Ala Val Gln Val Thr Glu Val
275 280 285

Ile Ala Tyr Thr His Cys Cys Val Asn Pro Val Ile Tyr Ala Phe Val
290 295 300

Gly Glu Arg Phe Arg Lys Tyr Leu Arg Gln Leu Phe His Arg Arg Val
305 310 315 320

Ala Val His Leu Val Lys Trp Leu Pro Phe Leu Ser Val Asp Arg Leu
325 330 335

Glu Arg Val Ser Ser Thr Ser Pro Ser Thr Gly Glu His Glu Leu Ser
340 345 350

Ala Gly Phe
355

【0057】

【図面の簡単な説明】

【図1】λgt 11のEco RI 部位にクローン化したヒトMIP-1α/RANTES受容体のコード領域をふくむ塩基配列と、それにコードされるアミノ酸配列を示す。

【図2】ヒトMIP-1α/RANTES受容体発現ベクターpCCRの構築方法および構築図を示す。

【図3】ヒトMIP-1α/RANTES受容体発現CHO細胞(CHO/CCR細胞)に対する¹²⁵I-RANTESの結合。96 ウェルプレートでコンフルエントとなった CHO/CCR細胞およびmock transfectants に 5 nMの¹²⁵I-RANTESを加え、細胞への結合を調べた。値は、3 ウェルの測定値の平均値±標準誤差で表した。

【図4】ヒトMIP-1α/RANTES受容体発現CHO細胞(CHO/CCR細胞)に対する¹²⁵I-MIP-1αの結合。96 ウェルプレートでコンフルエントとなった CHO/CCR細胞および mock transfectants に 5 nMの¹²⁵I-MIP-1αを加え、細胞への結合を調べた。値は、3 ウェルの測定値の平均値±標準誤差で表した。

* 【図5】CC ケモカインによるヒトMIP-1α/RANTES受容体発現CHO細胞(CHO/CCR細胞)の遊走。50 nM RANTESによるCHO/CCR細胞およびmock transfectantsの遊走を示す。

【図6】CC ケモカインによるヒトMIP-1α/RANTES受容体発現CHO細胞(CHO/CCR細胞)の遊走。種々の CC ケモカインによるCHO/CCR細胞の遊走を示す。

【図7】ヒトMIP-1α/RANTES受容体発現CHO細胞(CHO/CCR細胞)におけるCC ケモカインに反応した細胞内Ca²⁺濃度の一過性の上昇。CHO/CCR細胞およびmock transfectantsを100 nM RANTES(矢印)で刺激したときの細胞内Ca²⁺濃度の変動を示す。矢印の時点でCC ケモカインを添加した。

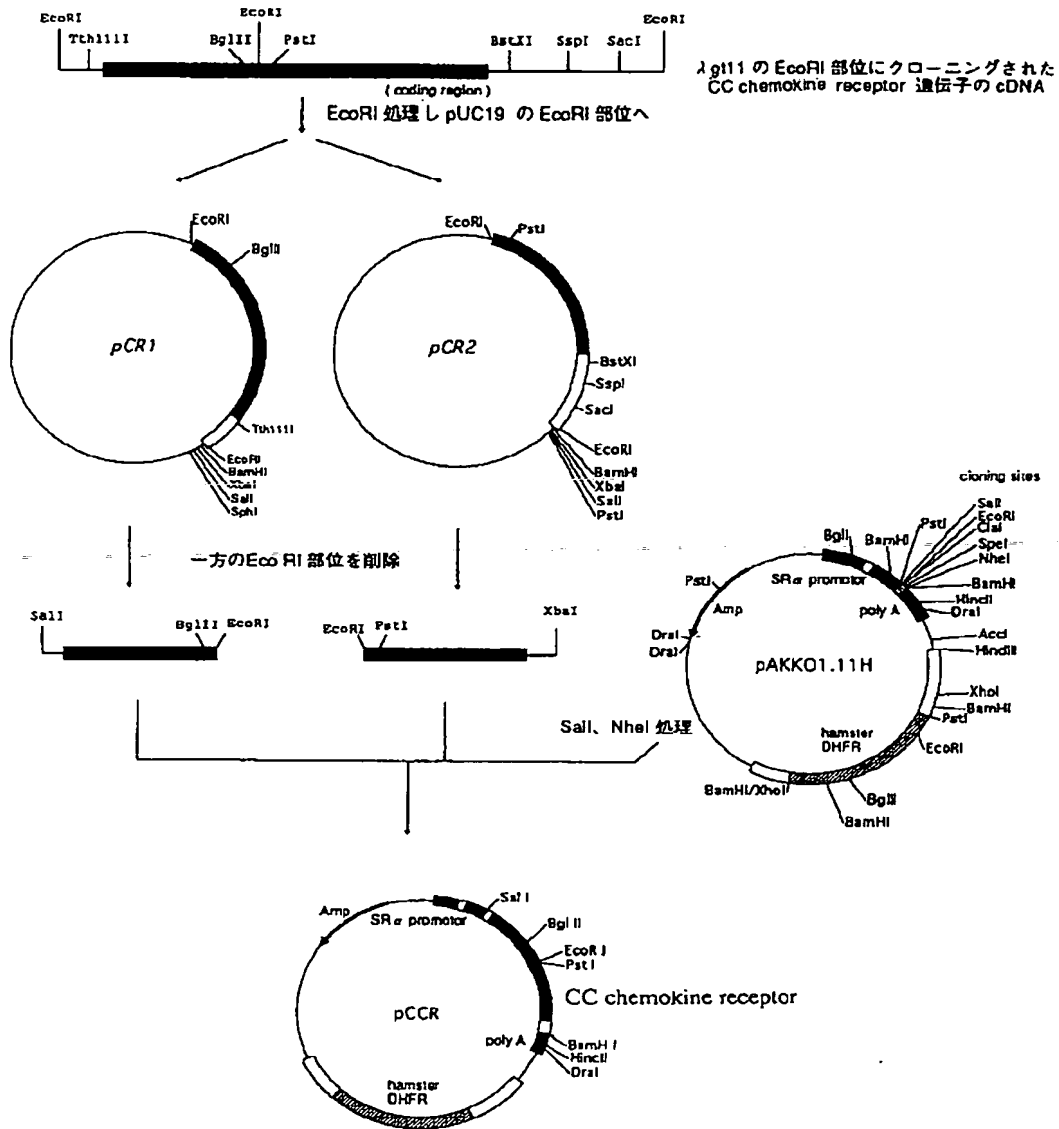
【図8】ヒトMIP-1α/RANTES受容体発現CHO細胞(CHO/CCR細胞)におけるCC ケモカインに反応した細胞内Ca²⁺濃度の一過性の上昇。CHO/CCR細胞を種々の CC ケモカインで刺激したときの細胞内Ca²⁺濃度の変動を示す。矢印の時点でCC ケモカインを添加した。

*

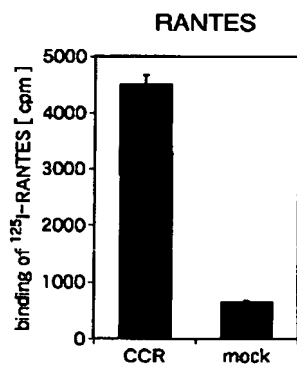
【図1】

-114	cggcatagtacctgcatgatgggatcatttgtatcctaatttcatatcataca	-61
-60	atatgccccagaaacaaagacttcacggacaaagtcccttggaaaccagagagaagccggg	-1
1	atggaaactccaaacaccacagaggactatgacacgaccacagagtttgactatggggat	60
	M E T P N T T E D Y D T T T E F D Y G D	
61	gcaactccgtgccagaaggtgaacgagagggcctttggggcccaactgctgccccctctg	120
	A T P C Q K V N E R A F G A Q L L P P L	
121	tactccttggtatttgtcattggcctggttggaaacatcctggtggtcctggtccttgtg	180
	Y S L V F V I G L V G N I L V V L V L V	
181	caatacaagaggctaaaaaacatgaccagcatctacctcctgaacctggccatttctgac	240
	Q Y K R L K N M T S I Y L L N L A I S D	
241	ctgctcttctgttcacgcttcccttctggatcgactacaagttgaaggatgactgggtt	300
	L L F L F T L P F W I D Y K L K D D W V	
301	tttgggtgatgccatgtgtoagatcctctctggtttttattacacaggttgtagcagcag	360
	F G D A M C K I L S G F Y Y T G L Y S E	
361	atctttttcatcatcctgctgacgattgacaggtacctggccatcgctccacgccgtgttt	420
	I F F I I L L T I D R Y L A I V H A V F	
421	gccttgcgggcacggaccgtcaccttttgggtgcatcaccagcatcatcatttgggccctg	480
	A L R A R T V T F G V I T S I I I W A L	
481	gccatcttggcttccatgccoggettatacttttccaagaccaatgggaattcactcac	540
	A I L A S M P G L Y F S K T Q W E F T H	
541	cacacctgcagccttcactttcctcacgaaagcctacgagagtggagctgtttcaggct	600
	H T C S L H F P H E S L R E W K L F Q A	
601	ctgaaactgaacctcttgggctggtattgcctttgttggtcatgatcatctgctacaca	660
	L K L N L F G L V L P L L V M I I C Y T	
661	gggattataaagattctgctaagacgaccaaatagagaagaaatccaaagctgtccgtttg	720
	G I I K I L L R R P N E K K S K A V R L	
721	atttttgtcatcatgatcatcttttttctcttttggacccctacaatttgactatactt	780
	I F V I M I I F F L F W T P Y N L T I L	
781	atttctgttttccaagacttccgtgttccccatgagtgtagcagagcagacatttggac	840
	I S V F Q D F L F T H E C E Q S R H L D	
841	ctggctgtgcaagtgaagggtgatcgctacacgcactgctgtgcaaccagtgatc	900
	L A V Q V T E V I A Y T H C C V N P V I	
901	tacgccttcgttgggtgagaggttccggaagtacctgaggcagttgttccacaggcgtgtg	960
	Y A F V G E R F R K Y L R Q L F H R R V	
961	gctgtgcacctggttaaattggctccccttctctccgtggacaggctggagaggggtcagc	1020
	A V H L V K W L P F L S V D R L E R V S	
1021	tccacatctccctccacaggggagcatgaactctctgctgggttctgactcagaccatag	1080
	S T S P S T G E H E L S A G F *	
1081	gaggccaacccaaaataagcaggcgtgacctgccaggcacactgaccagcagcctggctc	1140
1141	tcccagccaggttctgactcttggcacagcatggagtcgcctcttggatagagaggaat	1200
1201	gtaatggtggcctggggcttctgaggccttctgggcttgagtcttttccatgaacttctcc	1260
1261	cctggtogaaaagaagatgaatgagcaaaaccaaataattccagagactgggactaagtgt	1320
1321	accagogaagggcttggactcaagcaagatttcagatttgtgaccattagcatttgtcaa	1380
1381	caaagtcacccacttcccactattgcttgcacaaaccaatataaccagtagtggtgact	1440
1441	gtgggctccattcaaagtgaagctcctaagccatgggagacactgatgtatgagga	1495

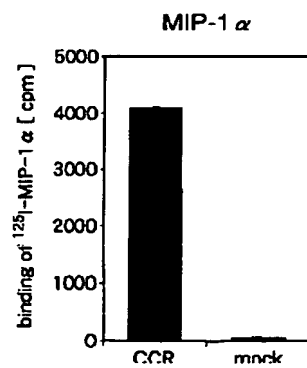
【図2】



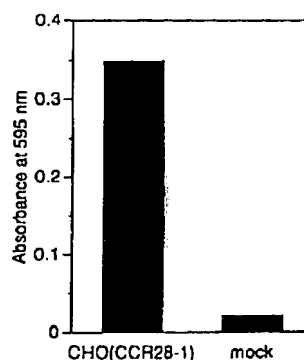
【図3】



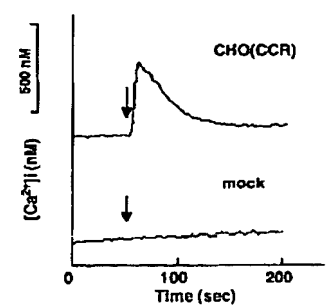
【図4】



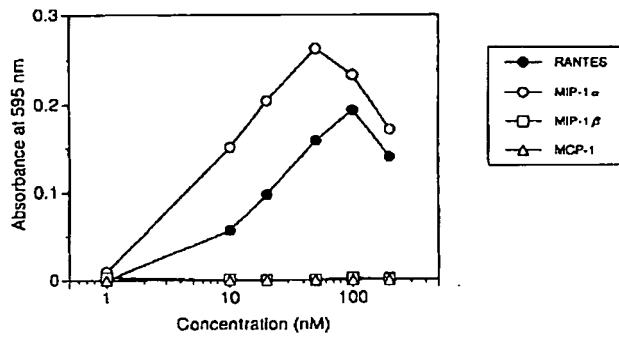
【図5】



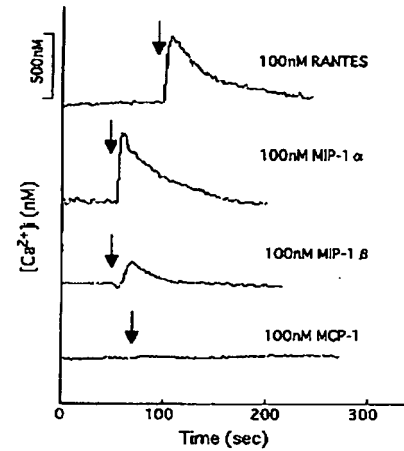
【図7】



【図 6】



【図 8】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

A 61 K 45/00

識別記号

A B G

A B J

A B N

A B R

A B X

A B Y

A C D

A C J

A C L

A C V

A D N

A D P

A D U

A D Z

A E D

Z N A

庁内整理番号

F I

A 61 K 45/00

技術表示箇所

A B G

A B J

A B N

A B R

A B X

A B Y

A C D

A C J

A C L

A C V

A D N

A D P

A D U

A D Z

A E D

Z N A

C 07 K 14/705

C 12 N 5/10

15/09

C 12 P 21/02

C 12 Q 1/00

// (C 12 P 21/02

C 12 R 1:91)

(C 12 Q 1/00

C 12 R 1:91)

7823-4B

9282-4B

C 07 K 14/705

C 12 P 21/02

C 12 Q 1/00

C 12 N 5/00

15/00

C

C

B

A